

Glicación *in vitro* de lipoproteínas de baja densidad y aterogenicidad en cultivos celulares

In vitro glycation of low-density lipoproteins and atherogenicity in cell culture

► Catalina Beatriz De Marco^{1*,**}, Adriana Elena Scoccia^{2**}, María Silvina Molinuevo^{3**},
María Carmen Apezteguía^{4**}, Susana Beatriz Etcheverry^{5**}

-
1. Bioquímica.
 2. Lic. en Farmacia y Bioquímica.
 3. Dr. de la Facultad de Ciencias Exactas.
 4. Lic. en Matemática.
 5. Dr. en Ciencias Farmacéuticas.

* Hospital Interzonal General de Agudos General San Martín, 1 esq. 70, 1900 La Plata, Argentina.

** Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.

SBE es miembro de la Carrera de Investigador del CONICET, Argentina. MSM es becaria del CONICET, Argentina. MCA es miembro de la Carrera del Personal de Apoyo a la Investigación Científica de la CICPBA, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Resumen

La hiperglucemia sostenida incrementa la glicación de proteínas. En particular, las modificaciones en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumentan su potencial aterogénico. En este trabajo se comparan las modificaciones producidas por la glicación *in vitro* de LDL aisladas por dos métodos: precipitación selectiva (PS) y ultracentrifugación (UC). Para ello, se determinó el incremento de fructosamina, el consumo de los grupos ϵ -amino de lisina, guanidinio de arginina y la disminución de residuos de triptofano. Para todos los analitos, los resultados cinéticos indicaron diferencias significativas con relación al basal ($p < 0,05$), coincidentes para ambos métodos en el tiempo de aparición y en el porcentaje de variación. La aterogenicidad de las LDL glicadas separadas por PS fue estudiada en cultivos de macrófagos RAW 264.7 evaluando la formación de células espumosas y cuantificando la incorporación de LDL por tinción de los depósitos lipídicos con *Oil Red*. Los resultados indican que la captación de LDL modificadas aumentó con el tiempo de incubación, siendo mayor la aterogenicidad de las LDL glicadas respecto de las nativas ($p < 0,001$, 1 h a 37 °C). El procedimiento de PS seleccionado, accesible al laboratorio bioquímico clínico, permite evaluar las modificaciones por glicación que sufren las LDL en pacientes diabéticos.

Palabras clave: glicación * lipoproteínas de baja densidad * precipitación selectiva de lipoproteínas de baja densidad * aterogenicidad * macrófagos

Summary

Long-term hyperglycemia increases protein glycation. In particular, modifications in the low-density lipoproteins (LDL) increase their atherogenic potential. In this study, the modifications caused by in vitro glycation of LDL separated by two methods: selective precipitation (SP) and ultracentrifugation (UC) were compared. Increase fructosamine level, decrease of ϵ -amino group of lysine, guanidinio of arginine and triptophan fluorescence were

determined. Results showed significant differences vs. basal ($p < 0.05$) for all the tested parameters, with coincidence for the two separation methods both in time and grade of modifications. The atherogenicity of glycated LDL separated by SP was studied in macrophages RAW 264.7 in culture, through the formation of foam cells and the quantification of the dye taken up by the cellular storage lipids. Results show that the uptake of modified LDL by macrophages increased with the time of incubation, being the atherogenicity of glycated LDL greater than native LDL ($p < 0.001$, 1 h at 37 °C). The selected SP procedure, within the facilities of routine biochemical laboratory, enables the evaluation of the modifications caused by glycation in the LDL of diabetic patients.

Key words: glycation * low density lipoproteins * selective precipitation of low density lipoproteins * atherogenicity * macrophages

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un fuerte factor de riesgo para el establecimiento de aterosclerosis (1-3). La hiperglucemia sostenida produce un incremento en el nivel de glicación de proteínas plasmáticas y estructurales. En particular, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son afectadas por glicación y glicoxidación produciéndose en ellas modificaciones fisicoquímicas y alteraciones del metabolismo, que involucran no sólo la porción proteica, sino además al componente fosfolipídico (4). Entre los efectos provocados en la fracción proteica se encuentra un aumento en la fructosamina (5) (6) y modificación de los residuos de lisina, arginina y triptofano (7-11); además, se altera la interacción de las LDL con su receptor (Apo B 100/E) y, por lo tanto, su aclaramiento, pudiendo contribuir así a elevar los niveles de LDL en individuos con diabetes (12). Estas LDL modificadas son tomadas por los macrófagos a través de receptores *scavenger* y mediante otros mecanismos aún no dilucidados. Su transformación en células espumosas constituye una etapa relevante en la iniciación de la lesión aterosclerótica (13). Por este motivo, la captación de LDL modificadas ha sido extensamente estudiada en cultivos celulares (14) (15).

Las LDL pueden ser aisladas del suero o plasma por diferentes métodos (16). La precipitación selectiva (PS), de amplia aplicación en el laboratorio clínico, correlaciona bien con la ultracentrifugación (UC) en cuanto a la composición en colesterol de las LDL aisladas (17).

La primera demostración del incremento de la glicación de las apolipoproteínas expuestas a altas concentraciones de glucosa data de 1981 (18). A partir de allí, en particular la glicación de las LDL aisladas por UC, ha sido ampliamente investigada frente a distintas concentraciones de glucosa, variando las condiciones de ensayo, garantizando la esterilidad y minimizando los fenómenos de oxidación y de degradación de pro-

teínas (12) (19) (20); sin embargo, este tipo de estudios no ha sido planteado para LDL separadas por técnicas de precipitación selectiva.

El propósito de este trabajo fue aislar LDL de un *pool* de sueros por un método de PS con citrato-heparina (17) y por UC seguida por cromatografía de filtración en gel (21), y evaluar comparativamente la naturaleza, cinética y extensión de las modificaciones de las LDL sometidas a glicación, en presencia de antibióticos, antioxidantes e inhibidores de proteasas. Las alteraciones fisicoquímicas fueron investigadas sobre la base del consumo de los grupos ϵ -amino de lisina, guanidinio de arginina y a través de la disminución de la fluorescencia a 280 nm atribuida al triptofano. Se midió también en la misma fracción el incremento de fructosamina o producto de Amadori, como indicador de glicación temprana. Se monitoreó la ausencia de productos de peroxidación lipídica mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (13).

A continuación, se investigó la capacidad aterogénica de las LDL precipitadas y glicadas, en cultivos celulares de una línea de macrófagos de ratón (RAW 264.7) por observación microscópica de células espumosas y cuantificación del colorante *Oil Red* extraído de las gotas de lípidos depositados en el citoplasma de los macrófagos (14).

La expectativa de este trabajo es extender al laboratorio clínico a través de mediciones sencillas, determinaciones que evalúen el grado de glicación de las LDL, para aportar un dato útil que complemente la evaluación del paciente diabético.

Materiales y Métodos

MATERIALES

Heparina sódica 50.000 U/L (Northia); citrato de sodio (Mallinckrodt); bromuro de sodio y ácido etilen-

diaminotetracético sal sódica (EDTA) (Laboratorios Anhedra); penicilina/estreptomina (Laboratorios Richet); glucosa, hidroxitoluenobutilado (BHT), fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF), Coomassie Brilliant Blue G-250, ácido trinitrobenzensulfónico, L-lisina, L-arginina, triptofano, azul de nitro tetrazolio y 1,1,3,3-tetrametoxipropano (malondialdehído, MDA) de Sigma Chemical; acetato de celulosa (Helena); medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco); *Oil Red* (Chemar). Otras drogas y reactivos de fuente comercial y grado analítico.

MUESTRA

Para el aislamiento de las LDL se utilizó una mezcla de sueros frescos, obtenidos por punción venosa de personas adultas sanas con un ayuno de 12 horas, sin enfermedad aparente detectada sobre la base de los análisis químico-clínicos. Una alícuota de la misma se conservó en heladera a 4 °C hasta su procesamiento dentro de las 6 horas por el método de PS y otra fue inmediatamente suplementada con EDTA 1 mM y conservada en heladera a 4 °C hasta su procesamiento por el método de UC.

Métodos

AISLAMIENTO DE LAS LDL POR PRECIPITACIÓN SELECTIVA

El reactivo precipitante contenía citrato de sodio 64 mmol/L, pH 5,12 y heparina sódica 50.000 U/L. Se precipitaron las LDL adicionando 1 mL de reactivo por cada 10 mL de suero. Se mezcló e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 min a 3.000 rpm y se procedió a lavar el precipitado una vez con solución fisiológica (NaCl 9 g/L). Se resuspendieron las LDL con solución de NaCl 5% en *buffer* fosfato 0,05 M, pH 7,2 en el volumen necesario para obtener una solución lipoproteica con una concentración de proteínas entre 3 g/L y 4 g/L.

AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LAS LDL POR CROMATOGRFÍA

Para la flotación se disolvieron 0,282 g de NaBr por cada mililitro de muestra, homogeneizando en hielo y protegido de la luz. Se ajustó la densidad a 1,21 g/mL. Para la ultracentrifugación se emplearon tubos Beckman de 26,3 mL de capacidad y se centrifugaron con rotor de ángulo fijo Beckman tipo Ti serie 9702729 a 55.000 rpm durante 44 horas a 4 °C. Se aspiró el contenido lipoproteico concentrado en la porción superior de cada tubo con pipeta Hamilton. Para fraccionar las LDL se usó el método de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), empleando para tal fin una

columna de Sephacryl S 300 (22). Se sembró la totalidad del volumen obtenido en la etapa anterior y se efectuó la elusión con *buffer* tris 10 mM-NaCl 0,15 M y azida 0,01%, pH 8,0, con una velocidad de flujo de 0,5 mL por minuto. Las distintas fracciones lipoproteicas se identificaron con un detector para luz ultravioleta Pharmacia LKB Uvicord SII (Upsala, Suecia) y se recolectó la correspondiente al segundo pico de elusión cromatográfico propio de las LDL.

CARACTERIZACIÓN DE LAS LDL

Se tomaron alícuotas de las LDL aisladas por los dos métodos, y se sometieron a electroforesis en acetato de celulosa seco, empleando *buffer* tris barbital pH 8,8 y fuerza iónica $\mu=0,075$. La corrida se efectuó a 150 V, durante 30 min. Se coloreó con una solución de Azul brillante de Coomassie G-250 al 0,1% en solución de metanol-ácido acético-agua (45:10:45 v/v) durante 10 min, procediendo luego a su decoloración con la solución metanol-ácido acético-agua (45:10:45 v/v).

CINÉTICA DE GLICACIÓN

Se cuantificó previamente el contenido proteico de las LDL aisladas por PS y por UC. Se ajustó la concentración proteica a un valor equivalente a 3 g/L con *buffer* PBS. Inmediatamente, se adicionaron a ambos productos los volúmenes necesarios de *buffer* PBS para obtener concentraciones finales de EDTA 1 mM, penicilina 100 UI/mL, estreptomina 100 μ g/mL, BHT 20 μ M y PMSF 0,5 mM (19).

Las mezclas resultantes fueron prefiltradas empleando papel de filtro y esterilizadas posteriormente por filtración bajo campana de flujo laminar.

Ensayo cinético: se fraccionaron alícuotas del producto esterilizado que contenía a las LDL y se fue adicionando glucosa estéril de manera de obtener una concentración final de la misma de 200 mM. Los agregados de glucosa comenzaron por la alícuota que fue incubada a 37 °C durante 16 días y se continuó sucesivamente para obtener los tiempos de incubación correspondientes a los días 12, 8, 4, 2, 1 y 0 (basal). Una alícuota control sin glucosa fue incubada en las mismas condiciones durante 16 días. Al final de los mismos, una alícuota correspondiente a cada día fue dializada a través de una membrana de permeabilidad selectiva de 15 kDa, y el volumen inicial fue reconstituido con *buffer* PBS estéril, ajustando la concentración proteica a 1,5 g/L. Las alícuotas así obtenidas fueron conservadas a -20 °C para las determinaciones químicas y el estudio de aterogenicidad en cultivos celulares.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se cuantificó el contenido proteico en la fracción de las LDL mediante el método de Bradford (23). Se

dispensaron 10 μ L de las LDL aisladas a 2 mL de reactivo: Azul brillante de Coomassie G-250 al 0,01% (p/v) en etanol al 95% y ácido fosfórico 8,5% (p/v). Se leyeron las absorbancias del complejo formado a 595 nm entre 2 minutos y 1 hora. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y la concentración proteica se calculó a partir de una curva de calibración empleando un estándar de seroalbúmina bovina.

DETERMINACIÓN DE L-LISINA

La presencia de amino grupos reactivos se estimó usando el ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) (24). Brevemente, 100 μ L de las LDL aisladas se mezclaron con 1 mL de NaHCO₃ al 4%, pH 8,4 y 100 μ L de TNBS. Se incubó 1 hora a 37 °C, se adicionaron 100 μ L de HCl 1N para frenar la reacción y se procedió a la lectura de absorbancias a 340 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y el contenido de lisina en las LDL se calculó mediante una curva de calibración a partir de una solución madre de L-lisina 2 mM. El coeficiente de variación intraensayo (CV%) fue de 8% para 20 repeticiones. Los resultados finales se expresaron en forma relativa al contenido proteico en nmoles de L-lisina/mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE ARGININA

Se cuantificó el contenido de arginina en la fracción LDL mediante el método propuesto por Sastry y col. (25). Brevemente, a 50 μ L de las LDL aisladas se le adicionaron sucesivamente 530 μ L de agua destilada, 400 μ L de solución de timol al 0,02% en NaOH 0,01N e hipobromito de sodio 2% en NaOH al 5%. Se leyeron las absorbancias de las especies coloreadas a 440 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y el contenido de arginina se calculó mediante una curva de calibración a partir de una solución madre de arginina al 1% (p/v) en NaCl al 5%. El coeficiente de variación intraensayo (CV%) fue de 3% para 20 repeticiones. Los resultados finales se expresaron en forma relativa al contenido proteico en nmoles de arginina/mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO

Se cuantificó el contenido de triptofano en las LDL empleando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman SPF 100 (Silver Spring, Maryland, EE.UU.) utilizando una λ de excitación de 280 nm y λ de emisión de 335 nm (7). Se utilizó un patrón de quinina en ácido sulfúrico (1 μ g/mL) para calibrar y monitorear el funcionamiento de la lámpara. Se tomaron 200 μ L de las LDL llevando a un volumen final de 1 mL con *buffer* PBS, usando como estándar una solución de triptofano 1 mM. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los resultados finales se expresaron en forma relativa

al contenido proteico en nmoles de triptofano /mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE FRUCTOSAMINA

Se utilizó el método de la fructosamina para caracterizar los productos de glicación tempranos sobre las proteínas (5) (26). Brevemente, a 1 mL de reactivo que contenía una solución de azul de nitro-tetrazolio 0,25 mM en *buffer* carbonato de sodio 0,1 M, pH 10,8, se le adicionaron 150 μ L de las LDL. Se incubó a 37 °C y se leyeron las absorbancias del producto formado a 530 nm a los 10 y 15 min de incubación. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y la concentración de fructosamina se calculó a partir de las diferencias de absorbancias mediante una curva de calibración empleando para tal fin un estándar de desoximorfolino-fructosa de concentración 3,6 mmol/L. El resultado final se expresó en forma relativa al contenido proteico en nmoles de fructosamina/mg de proteína.

INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN LIPÍDICA

El grado de oxidación lipídica de las LDL sometidas a glicación fue evaluado mediante la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (13). Brevemente, 100 μ L de las LDL se incubaron con 0,5 mL de ácido acético 20% (p/v), pH 3,5 y 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (p/v). Se llevó a baño María durante 45 min, al cabo de los cuales las muestras fueron enfriadas y extraídas con butanol. Se centrifugó a 4.000 rpm y el color rosado del sobrenadante se leyó a 530 nm. Los resultados se obtuvieron a partir de una curva de calibración, empleando un estándar de MDA y se expresaron en forma relativa al contenido proteico como mmoles MDA/mg de proteína.

CULTIVOS CELULARES

La línea celular RAW 264.7 se cultivó en frascos de 75 cm² en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 UI /mL y estreptomina 100 μ g/mL, en atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron despegadas del frasco de crecimiento usando solución salina fosfato tamponada (PBS)-1 mM EDTA y se resuspendieron en RPMI- 10% FBS. Para los ensayos, los macrófagos se cultivaron en placas multicilios de cultivo celular.

ENSAYO DE ATEROGENICIDAD IN VITRO

La aterogenicidad de las LDL aisladas por precipitación selectiva (nativas y glicadas) se evaluó a través de un ensayo de captación *in vitro*, empleando macrófagos en cultivo.

El ensayo cinético se llevó a cabo incubando 30 μ L de LDL recién precipitadas (LDL nativa) o glicadas (LDL glicada) con la monocapa celular durante 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min. Luego de cada período de incubación, las células se fijaron con formalina durante 10 min y se colorearon con el colorante para lípidos *Oil Red* 0,2% en 2-propanol 60% durante 10 min; de este modo, los depósitos de lípidos se verán teñidos de color rojo. Los preparados se observaron en un microscopio óptico Nikon 5000 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron captadas empleando una cámara digital.

Por otro lado, la cuantificación de la incorporación se efectuó a través de la extracción del colorante. Las células fueron fijadas y teñidas como se explicó en el párrafo anterior. Luego de lavar para retirar el exceso de colorante, el mismo se extrajo con 1 mL de dimetil sulfoxido (DMSO). El extractivo se transfirió a tubos de Khan y la absorbancia del extracto se determinó a 520 nm. La determinación se realizó por cuadruplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada uno de los métodos de aislamiento de las LDL estudiados se aplicó un análisis de varianza con contraste simple para comparar el tiempo 0 de incubación (basal) con los demás. Para el ensayo de captación del colorante *Oil Red* en cultivos celulares se empleó el *test t* de Student para analizar las diferencias entre las LDL nativas y glicadas. Los valores para $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

CARACTERIZACIÓN DE LAS LDL

Las electroforesis de los productos obtenidos por ambos métodos de aislamiento de las LDL revelaron la presencia de una banda definida con movilidad β comparada con un suero empleado como referencia. Para la PS se observó ligera contaminación con albúmina (Fig.1).

CINÉTICA DE GLICACIÓN DE LAS LDL

El tiempo 0 del ensayo se tomó como basal y los resultados se expresaron como porcentaje del mismo.

LISINA

Se observó diferencia significativa respecto al basal a partir del día 1 coincidiendo para ambos métodos, con un valor $p=0,035$ para la PS y $p=0,008$ para UC. El consumo de lisina fue aproximadamente 24% para el primer día tanto para la PS como para la UC, alcanzando al día 16 valores de 49% y 51%, respectivamente (Fig. 2A).

ARGININA

Se observó diferencia significativa respecto al basal a partir del día 1 para ambos métodos con $p < 0,001$ tanto para la PS como para la UC. El consumo de arginina al primer día fue 38% para la PS y 42% para la UC, alcanzando al día 16 valores de 71% y 65%, respectivamente (Fig. 2B).

TRIPTOFANO

Se observó diferencia significativa respecto al basal a partir del día 1 para ambos métodos con $p < 0,001$ tanto para la PS como para la UC. El consumo de triptofano al primer día fue 17% para la PS y 18% para la UC, alcanzando al día 16 valores de 42% y 43%, respectivamente (Fig. 2C).

FRUCTOSAMINA

La diferencia significativa respecto al basal se observó a partir del día 2 para ambos métodos con un valor $p=0,007$ para la PS y $p=0,031$ para la UC. El incremento de fructosamina al segundo día fue de 140% para la PS y de 134% para la UC, alcanzando al día 16 valores de 215% y 217%, respectivamente (Fig. 2D).

PRODUCTOS DE OXIDACIÓN LIPÍDICA

No se detectaron especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (resultados no mostrados).

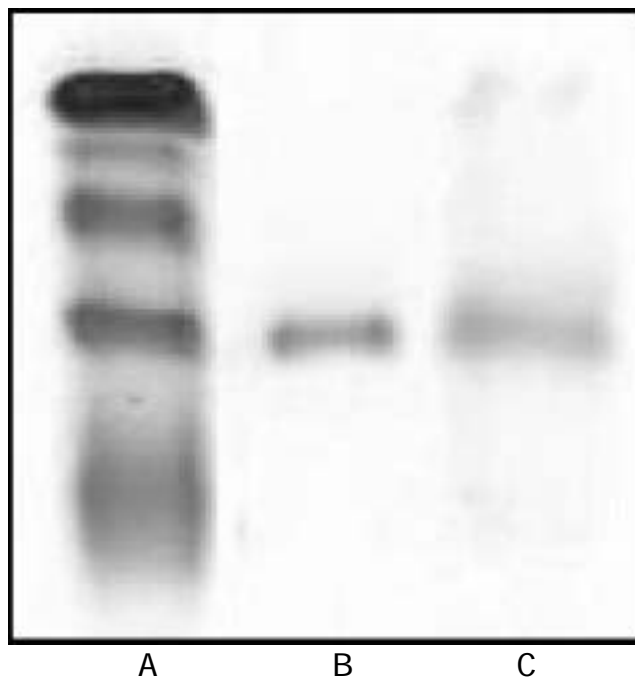


Figura 1. Caracterización de las LDL aisladas por electroforesis en acetato de celulosa. Suero normal (A), LDL fraccionadas por UC (B) y por PS (C). Las muestras se tiñeron con Coomassie Blue.

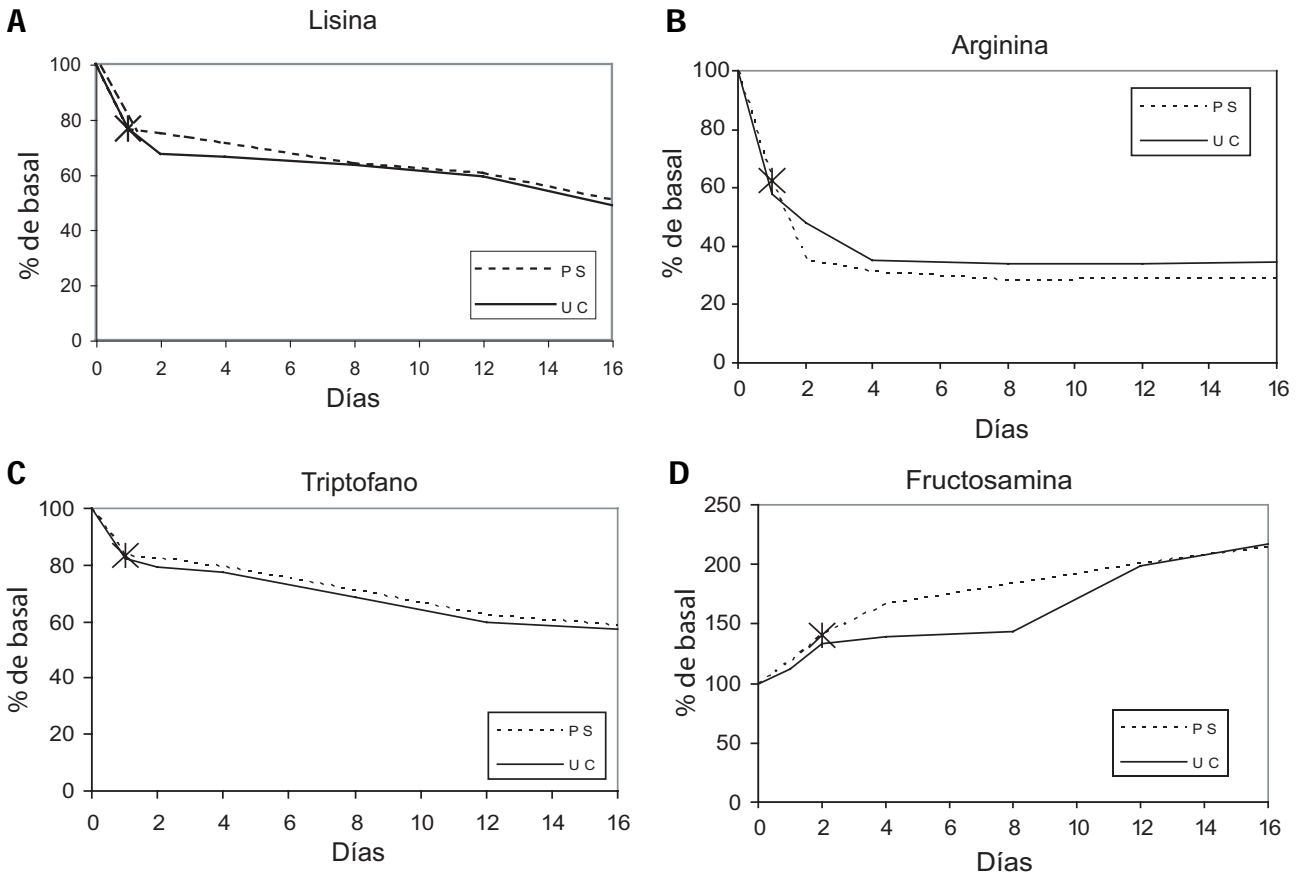


Figura 2. Glicación de LDL obtenida por PS (---) y UC (—).

LDL (1,5 g de proteínas/L), se incubaron con glucosa 200 mM hasta 16 días. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas para las cuantificaciones de lisina (A), arginina (B), triptofano (C) y fructosamina (D). Los resultados se expresaron en cada caso como porcentaje del basal. Cada punto representa la media \pm SEM de los replicados.

El asterisco (*) indica el tiempo a partir del cual los datos fueron estadísticamente diferentes comparados con el valor del tiempo 0.

EVALUACIÓN DE LA ATEROGENICIDAD DE LAS LDL AISLADAS POR PRECIPITACIÓN SELECTIVA EN CULTIVOS CELULARES DE MACRÓFAGOS

La observación al microscopio óptico de los macrófagos teñidos con *Oil Red* revela que en condiciones basales no se detectaron depósitos intracelulares de lípidos (Fig. 3A). Luego de 1 hora de incubación con LDL nativa se observaron unas pocas gotas lipídicas de tamaño pequeño en el citoplasma de los macrófagos (Fig. 3B, flechas), mientras que cuando las células se incubaron 1 hora con LDL glicada se observó la existencia de numerosas gotas de mayor tamaño teñidas intensamente con *Oil Red* (Fig. 3C, flechas). Por otro lado, la observación de la morfología de los macrófagos indica que se formaron células espumosas (células con depósitos de lípidos intracelulares) en aquellas células que se incubaron con LDL glicada (Fig. 3C), mientras que las células que se incubaron con LDL nativa conservaron su morfología normal (Fig. 3B). Esta diferencia morfo-

lógica constituye un indicio más de la mayor aterogenicidad *in vitro* de las LDL modificadas (Fig. 3C).

Para corroborar la observación anterior, se decidió cuantificar la incorporación de LDL (nativa y glicada) por medio de la extracción del colorante que tiñe los depósitos de lípidos intracelulares. La incorporación de LDL glicada resultó significativamente mayor que la incorporación de LDL nativa, en los tiempos estudiados. Los macrófagos RAW 264.7 incorporaron las LDL modificadas a partir de los 5 min de incubación ($144 \pm 6\%$ vs. LDL nativa; $p < 0.001$, Fig. 4), alcanzando el máximo a los 120 min de incubación ($155 \pm 2\%$ vs. LDL nativa, $p < 0.01$, Fig. 4). Por otro lado, la incorporación de LDL nativa resultó significativa solamente a los 120 min de incubación siendo cuantitativamente menor que la de LDL glicada (133 ± 6 y $155 \pm 2\%$ respectivamente, Fig. 4). Esta observación podría deberse al hecho de que al cabo de ese tiempo las LDL nativas podrían haber sufrido

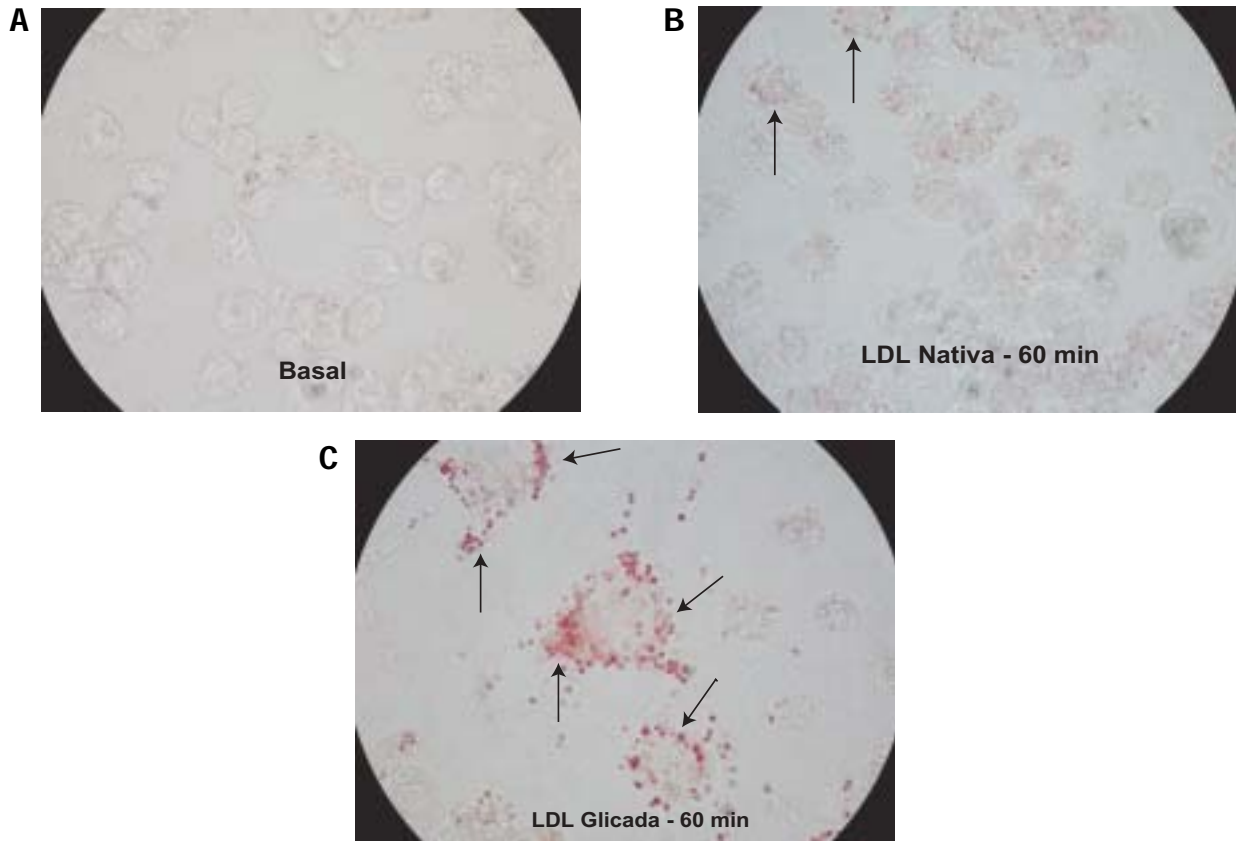


Figura 3. Observación microscópica de la captación de LDL aisladas por precipitación selectiva.

Macrófagos sin adición de LDL (Basal) (A). Luego de 1 hora de incubación con LDL nativa (B) o glicada (C), los macrófagos RAW 264.7 teñidos con *Oil Red* se observaron al microscopio óptico. Las flechas indican los depósitos lipídicos intracelulares (100 X).

una alteración en su estructura. Los cambios no serían tan importantes a tiempos más cortos.

Estos resultados también indican que existe una cinética de captación diferente para las LDL glicadas respecto a las nativas. Los receptores expresados por los macrófagos captan más eficientemente a las LDL modificadas por glicación en tanto que las LDL nativas son captadas más lentamente.

Discusión y Conclusiones

Estudios previos permitieron establecer la correlación entre el fraccionamiento de las LDL por PS y por UC. Sin embargo, en particular cuando el aislamiento se realiza con citrato-heparina pH $5,12 \pm 0,2$, se reconocen como limitaciones la presencia de concentraciones de triglicéridos superiores a 4 g/L y está en discusión la posibilidad de coprecipitación de remanentes de VLDL en casos de hiperlipoproteinemia tipo III (16) (17).

En relación a las condiciones seleccionadas para el ensayo de glicación, está comprobado que la concentración de glucosa utilizada (200 mM), a pesar de ex-

ceder ampliamente los niveles fisiológicos, genera en las LDL modificaciones comparables en concentración a las observadas en individuos con diabetes o insuficiencia renal (19). Por otro lado, teniendo en cuenta que el proceso de glicación puede ir acompañado de eventos oxidativos, se minimizó la posibilidad de que las modificaciones en las LDL se debieran a cambios oxidativos mediante el agregado de un antioxidante (BHT), que atrapa los intermediarios reactivos de la peroxidación lipídica (11) y por adición de EDTA que actúa como quelante de metales de transición que también promueven la oxidación lipídica (13); la ausencia de TBARS permitió concluir que se garantizaron condiciones no oxidativas durante todo el ensayo de glicación. Además, para el desarrollo total de la experiencia se tuvo en cuenta que los eventos de oxidación lipoproteica en presencia de protectores se vuelven significativos a partir de las dos semanas, en tanto que las reacciones de glicación serían eventos más tempranos (7).

Se observó concordancia en la extensión de las modificaciones y en el comportamiento cinético de las LDL aisladas por ambos métodos y sometidas a glica-

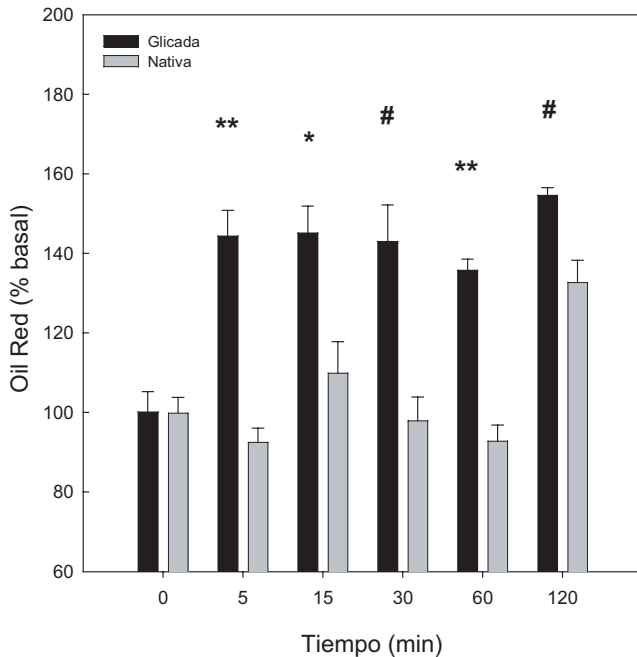


Figura 4. Estudio *in vitro* de aterogenicidad de LDL aisladas por precipitación selectiva.

Los macrófagos RAW 264.7 se incubaron con LDL nativa o glicada. Los resultados se expresaron como % basal y representan la media \pm SEM, n=6. ** p<0,001; # p<0,01, * p<0,02 (las diferencias son respecto a LDL nativa).

ción. Las diferencias para todos los analitos medidos resultaron significativas en tiempos más cortos que la vida media de las LDL. Estos resultados indican que estas determinaciones podrían aportar información útil acerca del riesgo aterogénico de LDL aisladas de sueros de pacientes diabéticos. Los resultados de la cinética mostraron un comportamiento especular entre la desaparición de los grupos ϵ -amino de lisina y el aumento de fructosamina, hecho esperable por tratarse de moléculas de un mismo camino metabólico (Reacción de Maillard).

Por otra parte, el descenso porcentual de arginina más marcado respecto a lisina en los días primero y final de incubación, fue comparable con experiencias de otros autores que la investigaron empleando la ultracentrifugación como método de aislamiento y la fluorescencia para su determinación (7). Este resultado podría explicarse sobre la base de una mayor velocidad de modificación para arginina que para lisina en función de la mayor concentración de lisina sobre arginina en la molécula de Apo B100 (356 lisinas vs. 148 argininas) (13). Además, se ha descrito previamente que la formación de oxoaldehídos en los procesos de glicación temprana potenciaría la actividad glicante, sin requerir a la fructosamina como precursor y estaría predominantemente dirigida a los residuos de arginina (8).

La disminución de la fluorescencia a 280 nm, correspondiente al consumo de residuos de triptofano, podría atribuirse a modificaciones en el entorno (28) o, si hubieran ocurrido procesos oxidativos, a su transformación vía quinurenina (29).

Los estudios en cultivos celulares permitieron demostrar el aumento en la aterogenicidad *in vitro* de las LDL glicadas obtenidas a partir de LDL precipitadas selectivamente en comparación con LDL nativas. Estos resultados muestran que mientras las LDL glicadas son rápidamente captadas (5 min) (Fig. 4) y producen la formación de células espumosas (Fig. 3C), las LDL nativas permanecen sin ser incorporadas por los macrófagos (Fig. 3B) hasta los 120 min de incubación (Fig. 4). Las observaciones microscópicas correlacionaron con los resultados de la cuantificación del colorante de lípidos intracelulares (Fig. 4). La captación de las LDL nativas a los 120 min de incubación puede deberse al hecho de que no se pueden descartar modificaciones oxidativas en las LDL nativas durante las incubaciones en el medio de cultivo (al que se le eliminaron los protectores de oxidación porque interfieren en la formación de las células espumosas según lo descrito por Mori, *et al* (14)), hecho que permitiría interpretar la aparición de unas pocas gotas lipídicas al cabo de 1 hora de incubación, como puede observarse en la Figura 3B. Esta observación también podría deberse, además, a la existencia de mecanismos inespecíficos o poco conocidos.

Sin embargo, se puede inferir que no existen transformaciones sustanciales en la molécula de LDL en el medio de cultivo al menos hasta 1 hora de incubación, ya que no se observa incremento en la captación de LDL nativa en este período (Fig. 3). Estos resultados se hallan en concordancia con resultados previos que indican que una vez glicadas, las LDL se convierten en ligandos activos para los receptores *scavenger*, los que ejercerían un rol fundamental en la acumulación intracelular de colesterol esterificado, paso requerido para la formación de células espumosas (30-32), consideradas como la primera etapa en la formación de ateromas. Otro estudio reportado recientemente sugiere, además, que la lipoproteína lipasa de los macrófagos facilitaría este proceso (33). Adicionalmente, las LDL glicadas constituirían un blanco preferencial para las modificaciones oxidativas y así contribuirían al mayor riesgo aterogénico del paciente diabético.

En conclusión, este trabajo permite poner al alcance del laboratorio bioquímico clínico la posibilidad de evaluar las modificaciones químicas ocurridas en las LDL por glicación. Las concordancias halladas entre el método de ultracentrifugación y la técnica de precipitación selectiva, alientan futuras investigaciones para abordar el estudio de las mismas a partir de una población de pacientes diabéticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Horacio Garda y a la Técnica Laura Hernandez del INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, por su apoyo en la obtención de LDL por ultracentrifugación. También agradecen a la Dra. Liliana Bruzzone de la División Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por las determinaciones de fluorescencia. Este trabajo ha sido subsidiado por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y por la Fundación Ciencias Exactas, UNLP.

CORRESPONDENCIA

PROF. DR. SUSANA B. ETCHEVERRY
Cátedra de Bioquímica Patológica
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115
1900 LA PLATA, Argentina
Fax: 0221 422 3409
E-mail: etcheverry@biol.unlp.edu.ar

Referencias bibliográficas

- Kannel WB, Magee DI. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease. The Framingham Study. *Diabetes Care* 1979; 2: 120-6.
- Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and arteriosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 463-524.
- Mc Millan DE. Development of vascular complications in diabetes. *Vasc Med* 1997; 2: 132-42.
- Actis Dato MS, Rebolledo OR. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas, su importancia en la diabetes mellitus. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 645-56.
- Sanguinetti S, Schreier L, Elbert A, Fasulo V, Ferrari N, Wikinski R. Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamine assay to evaluate the extent of LDL glycation. *Atherosclerosis* 1999; 143: 213-5.
- McCarthy AD. Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1995; 29: 173-90.
- Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Deant RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3572-82.
- Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043: 111-7.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999; 344: 109-16.
- González Flecha FL, Castello FR, Gagliardino JJ, Rossi JFPC. La glicación de las proteínas y su participación en enfermedades humanas. *Ciencia Hoy* 2000; 10: 48-55.
- Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 10828-32.
- Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, *et al.* Modification of low density lipoproteins by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91: 9441-5.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 341-90.
- Mori M, Itabe H, Higashi Y, Fujimoto Y, Shiomi M, Yoshizumi M, *et al.* Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum. *J Lipid Res* 2001; 42: 1771-81.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978; 15: 261-7.
- Rifai N, Warnick GR, McNamara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frantz ID Jr. Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clin Chem* 1992; 38: 150-60.
- Demacker PN, Hijmans AG, Brenninkmeijer BJ, Jansen AP, van't Laar A. Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30: 1797-800.
- Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. *FEBS Lett* 1981; 129: 1-4.
- Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7643-7.
- Artwohl M, Graier WF, Roden M, Bischof M, Freudenthaler A, Waldhäuse W, *et al.* Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes* 2003; 52: 1240-7.
- Yang CY, Chen HH, Huang MT, Raya JL, Yang JH, Chen CHH, *et al.* Pro-apoptotic low density lipoprotein sub-fractions in type II diabetes. *Atherosclerosis* 2007; 193: 283-91.
- Johansson I, Lundgren H. Chromatographic properties of sephacril S-300 superfine. *J Biochem Biophys Methods* 1979; 1: 37-44.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 24248-54.
- Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid. *Anal Biochem* 1966; 14: 328-36.
- Sastry CSP, Tummuru MK. Spectrophotometric determination of arginine in proteins. *Food Chem* 1984; 15: 257-60.
- Johnson RN, Metcalf PS, Baker JR. Fructosamine: a

- new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127: 87-95.
27. Nezelof C, Galle P, Hinglans N. Técnicas microscópicas. Barcelona: JIMS; 1975. p. 120-5.
 28. Zhang L, Kao YT, Qiu W, Wang L, Zhong D. Femtosecond studies of tryptophan fluorescence dynamics in proteins: local solvation and electronic quenching. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* 2006; 110: 18097-103.
 29. Yang Ch-Y, Gu Z-W, Yang M, Lin S-N, Siuzdak G, Smith CV. Identification of modified tryptophan residues in apolipoprotein B-100 derived from copper ion-oxidized low-density lipoprotein. *Biochemistry* 1999; 38: 15903-8.
 30. Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, *et al.* Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 1995; 230: 408-15.
 31. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakay M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 283-92.
 32. Lam M, Tan K, Lam K. Glycoxidized low density lipoprotein regulates the expression of scavenger receptors in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2004; 177: 313-20
 33. Zimmermann R, Pazenböck U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, *et al.* Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes* 2001; 50: 1643-53.
 34. de Nigris F, Gallo L, Sica V, Napoli C. Glycoxidation of low-density lipoprotein promotes multiple apoptotic pathways and NFkappaB activation in human coronary cells. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 101-8.

Aceptado para su publicación el 20 de abril de 2007